云 南 植 物 研 究 1990; 12(4): 467—469
Acta Botanica Yunnanica

美味牛肝菌原生质体再生菌丝的新方式

张鉴铭 郑玉萍 陈梅英
(中国科学院昆明植物研究所，昆明650204)

A NEW METHOD OF MYCELIA REGENERATION FROM THE PROTOPLASTS OF BOLETUS EDULIS

Zhang Jianming, Zheng Yuping, Chen Meiying
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica,* Kunming 650204)

关键词 美味牛肝菌；原生质体再生
Key words *Boletus edulis*; Protoplast regeneration

食用菌原生质体的分离并培养成再生菌丝是研究食用菌细胞融合和基因转移的一项技术。有的文章[1]已综述了有多种食用菌的原生质体已被分离，只有一些种的原生质体被培养成再生菌丝体，美味牛肝菌的原生质体虽已被分离但未培养成再生菌丝。食用菌原生质体可以通过不同方式再生菌丝体。Peberdy[2]曾论述过有的真菌是由原生质体膨大生长成形态不正常的类似出芽链的细胞而再生菌丝的较为特殊的方式。本文报道美味牛肝菌原生质体通过一种新的生长方式而发育成菌丝体。

材 料 和 方 法

1.实验材料 美味牛肝菌（*Boletus edulis* Bull.: Fr.）是从昆明市场上购买的野生新鲜子实体分离得菌种，保存于冰箱中马铃薯斜面培养基上。试验时再培养在培养液中，取培养2—4天的菌丝体用作分离原生质体的材料。

2.培养基 培养菌丝体的培养液为MS[3]配方加椰乳20 ml/l 配制。培养原生质体的培养液照已报道[4]的M_4培养基的组分配制。

3.酶溶液 照已报道[4]的2号酶液配制。

4.原生质体的分离和培养 液体培养2—4天的菌丝体用0.6 mol/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$的溶液洗涤后，用灭菌的滤纸吸去表面水分称量后放入酶液中，每ml约100 mg 菌丝。在

1989－06－23收稿

30°C静置处理3—4小时，在此期间轻轻摇动1—2次。酶解菌丝后的溶液经50—100 μm孔径的尼龙丝网过滤除去未被酶解的菌丝。滤液中仍然混有较小的未被酶解的菌丝碎片，用0.6 mol/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液按已报道的[5]通底离心管漂洗纯化原生质体的方法纯化得到较纯净的原生质体。原生质体接种于培养液中再稀释到一定密度，用血球计数器计数。用细胞培养瓶在25°C下作浅层液体培养，或用凹载片作悬滴培养以便连续观察原生质体生长过程。悬滴培养用普通显微镜观察，培养瓶中原生质体的生长发育用倒置显微镜观察。

液体培养18小时后，可把再生了壁的细胞移植在固体培养基平板上，在长成分散的肉眼可见的菌落时，再分别分离单个菌落，从而得到从单个原生质体再生的株系。

结果和讨论

1.分离美味牛肝菌的原生质体需要几种酶混合组成的酶液，本试验所用的酶液组合是分离尖顶羊肝菌原生质体时较好的酶液[4]，用它来分离美味牛肝菌原生质体也同样得到较好的产量，平均产量约4.6×10^6个原生质体/ml·100 mg，而最高产量可达到9.6×10^6个原生质体/ml·100mg。

2.原生质体培养成再生的菌丝体　分离纯化得到的原生质体呈圆球形，多数的直径在10 μm以下。在培养液中25°C下培养16小时后原生质体膨大变形，或呈椭圆形，或呈哑铃形，或呈短棒形，少数长得较长。24小时以后长成比正常菌丝粗的长棒形状，直径在10 μm以上，长度不等，已明显地进行了细胞分裂的生长，暂称这种粗棒状为“粗菌丝”。有少数“粗菌丝”上也可观察到长出细菌丝。培养30小时后可以明显看到从粗菌丝上长出了细的菌丝，有的疏散成单根，有的密集成丛地长出来。细菌丝的直径在3μm左右，等于液体培养中原菌丝的直径，这已经回复成了用以分离原生质体的母体菌丝同样的形状。再继续培养进而形成了菌丝体组成的菌丝群落，从而完成了从原生质培养成再生菌丝体的过程。美味牛肝菌原生质体在本试验的培养条件下，大多数是通过长成粗菌丝后再长出细的菌丝的过程而完成菌丝体再生的。

在培养初期也观察到类似酵母细胞的出芽和成串的念珠状生长。但未观察到从这种成串的念珠状上长出细的菌丝。出芽和念珠状生长进一步的发育如何，有待进一步观察。

3.美味牛肝菌原生质体在培养中，经过粗菌丝的生长阶段再生成菌丝，是食用菌原生质体在培养条件下的一种新的生长途径。在食用菌原生质体培养研究的报道中，曾报道过从再生了细胞壁的细胞直接长出菌丝[4]，像孢子萌发那样的生长形式；也有的丝状真菌的原生质体经过不正常的膨大而形成菌丝的报道[2]，未见到先长成比原菌丝粗3—5倍的粗菌丝再长成细的正常菌丝的报道。所以这是一种区别于已报道过的那些生长形式的另一种新的生长形式。

这种生长方式是一种正常的细胞分裂的生长形式，在粗棒状菌丝中可以明显地看到分隔细胞的细胞壁。这可证明这粗菌丝是细胞分裂形成的多细胞所组成，而不是一个细胞伸长形成的。比原菌丝粗3—5倍也不能认为是不正常的，在一个长的菌丝细胞被酶

解脱去细胞壁以后形成了原生质体，其直径应该比原来细胞的直径大，原菌丝的直径在 3 μm左右，而酶解后得到的球形原生质体的直径在10 μm 左右，比原菌丝的直径大 3 倍左右。原生质体再生细胞壁以后有了变形也不可能把它的直径再缩短 3 倍，再生壁以后接着细胞分裂多次长成的粗菌丝的直径也只可能是和原生质体的直径近似，这样就长成了比原菌丝粗 3 — 5 倍的粗菌丝。粗菌丝形成以后，由其本身固有的遗传性所决定，回复了出芽生长的方式，像孢子出芽那样长出了和原生菌丝一样粗的细菌丝。以后继续了它原来的生长，形成菌丝体的群落。

从上述原生质体再生菌丝体的生长过程看来，明显存在着从原生质体长成粗菌丝的、它的原生活史中不存在的生长阶段，类似于高等植物原生质体培养的再生细胞脱分化的生长阶段，以后再回复到它原有的菌丝正常生长的阶段。从原生质体到粗菌丝这一生长阶段的意义和应用价值如何，有待进一步研究。

参 考 文 献

1 大政正武．农业および园芸 1985; 60:200—204
2 Peberdy I F. Fungal wall and hypha growth. London: Cambridge University Press, 1979: 49—70
3 Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant* 1962; 15: 473—479
4 张鉴铭，郑玉萍，陈梅英等．云南植物研究 1989; 11(4): 449—452
5 张鉴铭，匡安秀．云南植物研究 1980; 3(3): 315—318

※　※　※　※　※

云南植物研究　增刊Ⅲ　目　次　1990年6月